

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Klaus Betke

**QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON ADENOSINDESAMINASE
IN DEN ERYTHROZYTEN BEI PATIENTEN MIT
VERSCHIEDENARTIGEN IMMUNDEFIZIENZEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Notburga Hennig

aus

Ebersbach/Sachsen

München 1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Klaus Bëtke

Quantitative Bestimmung von Adenosindesaminase in
den Erythrozyten bei Patienten mit verschieden-
artigen Immundefizienzen.

Inaugural- Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Notburga Hennig

aus

Ebersbach/Sachsen

München 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Marget

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 1978



meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung

A Versuchsbeschreibung

- Auswahl der Patienten
- Methode der Bestimmung von Adenosin-desaminase
- Ergebnis

B Diskussion

I Biochemie

- Aufbau, Umbau und Abbau von Adenosin
- Folgen des Adenosindesaminase-Mangels
- Folgen exogenen Adenosins
- Adenosindesaminase-Mangel und Immundefizienz
- Nachweismethoden von Adenosindesaminase in Erythrozyten
 - qualitative Nachweismethoden
 - quantitative Nachweismethoden
- Daten des Adenosindesaminase-Moleküls
 - Vorkommen und Reaktionsbedingungen
 - Adenosindesaminase-Isoenzyme
 - Molekulargewicht, Sulfhydrylgruppen, Konversionsfaktor

II genetische Aspekte

- multiple Bandenmuster der Adenosin-desaminase
- Verteilung der Adenosindesaminase-Varianten in verschiedenen ethnischen Gruppen
- Erbgang der Adenosindesaminase
- Genetik des Adenosindesaminase-Mangels
- "stummes" Allel
- Allelismus und chromosomale Lage der Adenosindesaminase-Gene
- Adenosindesaminase-Mangel: Mutation-Deletion

III klinisch-pathologische Daten

- klinische Daten
- Labordaten
- röntgenologische Daten
- pathologische Daten

IV Diagnostik, Klinik, Therapie der Immundefizienz mit Adenosindesaminase-Mangel

- pränatale Diagnostik
- Screening-Methode
- Therapie

Zusammenfassung

C Literaturverzeichnis

Einleitung

Die angeborene oder erworbene Immundefizienz äußert sich je nach Art der Defizienz mitunter in einer größeren Anfälligkeit entweder gegen Bakterien oder Viren.

Davon abgesehen waren auf Grund von klinischen und in vitro Studien bei Patienten mit Immunmangelercheinungen verschiedene mehr oder weniger typische Krankheitsbilder voneinander abzugrenzen.

Man unterscheidet zellgebundene Immunmechanismen, die vom Thymus beeinflußt werden (=T-Zell-System), und humorale Reaktionen, die bei Vögeln von der Bursa Fabricii beeinflußt sind (=B-Zell-System). Fehlt das T-Zell-System, z.B. bei der congenitalen Thymusaplasie, dem Di-George-Syndrom, so ist die zellvermittelte Immunität blockiert, und der Patient ist besonders anfällig gegen virale und fungale Infektionen. Fehlt das B-Zell-System, wie z.B. bei der bereits im Jahre 1952 von Bruton beobachteten Agammaglobulinämie, so sind die lymphatischen Organe, wie die Tonsillen, unterentwickelt. Im Blut dieser Patienten finden sich keine Plasmazellen und Plasmazellenvorstufen. Da diese Patienten keine Gammaglobuline bilden und auch die anderen humoralen Antikörper weitgehend fehlen, sind sie besonders durch die Toxine bakterieller Erreger bedroht. Fallen beide Systeme aus, spricht man vom schweren kombinierten Immundefekt (SCID). Diese Patienten bilden weder Gammaglobuline noch zeigen sie Reaktionen vom verzögerten Typ der Immunantwort.

Die SCID ist kein einheitliches Krankheitsbild, vielmehr kommt sie in Kombination mit verschiedenen Symptomen vor. Beispielsweise handelt es sich bei der Ataxia teleangiectasia um ein autosomal rezessives Leiden, bei dem neben neurologischen und vaskulären Defekten das zelluläre Immunsystem mit Thymusaplasie betroffen ist und die Ig-A-Globuline fehlen. Beim Wiskott-Aldrich-Syndrom handelt es sich um ein rezessives Erbleiden, das sich durch Thrombopenie,

Ekzem und Infektanfälligkeit äußert. Hierbei ist hauptsächlich das thymusabhängige System bei anatomisch normaler Thymusentwicklung betroffen. Die Globuline sind reduziert.

Ende 1972 berichtete E.Giblett erstmals von einem Mangel an Adenosindesaminase (ADA) in den Erythrozyten zweier nicht miteinander verwandter Kinder, die an SCID litten. Das Zusammentreffen beider seltenen Erscheinungen schien nicht zufällig zu sein. Bis zu Beginn unserer Studie wurde von 15 Kindern berichtet, die SCID und ADA-Mangel hatten.

Ziel unserer Untersuchung war, die Erythrozyten-ADA bei den Patienten unserer Klinik mit primären Immundefizienzen und deren Eltern und Geschwistern zu bestimmen. Als im Januar 1975 berichtet wurde, daß bei Kindern mit Leukämie und deren Eltern die ADA in den Lymphozyten signifikant geringer ist als in der Normalpopulation (98), wurden auch Kinder mit Leukämie und malignen Tumoren in die Studie aufgenommen.

Auswahl der untersuchten Patienten

Alle Patienten, die eine Immunmangelerkrankung hatten, wurden in unsere Studie aufgenommen, um bei den Kindern unserer Klinik bei allen vorkommenden Erkrankungen des Immunsystems den ADA-Status zu prüfen. Auch Patienten mit Autoimmunerkrankungen wurden untersucht.

Weil eine Studie, für die die ADA-Aktivität in den Lymphozyten an lymphatischer Leukämie erkrankter Kinder und deren Eltern bestimmt wurde, als Ergebnis zeigte, daß die ADA-Aktivität signifikant geringer war als bei den unauffälligen Vergleichspersonen (98), wurden auch die Leukämie-Kinder unserer Klinik in unsere Studie aufgenommen. Wir wollten prüfen, ob in deren Erythrozyten gegenüber der Norm veränderte ADA-Aktivität festzustellen ist. Wir untersuchten auch bei den Kindern unserer Klinik mit malignen Tumoren die Erythrozyten auf ihre ADA-Aktivität, weil sich im Serum von Tumor-Patienten eine erhöhte ADA-Aktivität findet, wobei die quantitative Erhöhung in den einzelnen Studien stark schwankt (58).

Soweit wir die Eltern unserer Patienten mit Immunmangelerkrankungen erreichen konnten, wurden auch deren Erythrozyten untersucht. Eltern, deren Kind an einer Immunmangelerkrankung gestorben war, wurden von uns schriftlich ersucht, uns Blut für die Untersuchung zur Verfügung zu stellen. Ein Teil der angeschriebenen Eltern konnte auf diese Weise mit untersucht werden. Auch die Geschwister unserer Patienten und sonstige Blutsverwandte wurden einbezogen (Tab.1).

Ekzem und Infektanfälligkeit äußert. Hierbei ist hauptsächlich das thymusabhängige System bei anatomisch normaler Thymusentwicklung betroffen. Die Globuline sind reduziert.

Ende 1972 berichtete E.Giblett erstmals von einem Mangel an Adenosindesaminase (ADA) in den Erythrozyten zweier nicht miteinander verwandter Kinder, die an SCID litten. Das Zusammentreffen beider seltenen Erscheinungen schien nicht zufällig zu sein. Bis zu Beginn unserer Studie wurde von 15 Kindern berichtet, die SCID und ADA-Mangel hatten.

Ziel unserer Untersuchung war, die Erythrozyten-ADA bei den Patienten unserer Klinik mit primären Immundefizienzen und deren Eltern und Geschwistern zu bestimmen. Als im Januar 1975 berichtet wurde, daß bei Kindern mit Leukämie und deren Eltern die ADA in den Lymphozyten signifikant geringer ist als in der Normalpopulation (98), wurden auch Kinder mit Leukämie und malignen Tumoren in die Studie aufgenommen.

Auswahl der untersuchten Patienten

Alle Patienten, die eine Immunmangelerkrankung hatten, wurden in unsere Studie aufgenommen, um bei den Kindern unserer Klinik bei allen vorkommenden Erkrankungen des Immunsystems den ADA-Status zu prüfen. Auch Patienten mit Autoimmunerkrankungen wurden untersucht.

Weil eine Studie, für die die ADA-Aktivität in den Lymphozyten an lymphatischer Leukämie erkrankter Kinder und deren Eltern bestimmt wurde, als Ergebnis zeigte, daß die ADA-Aktivität signifikant geringer war als bei den unauffälligen Vergleichspersonen (98), wurden auch die Leukämie-Kinder unserer Klinik in unsere Studie aufgenommen. Wir wollten prüfen, ob in deren Erythrozyten gegenüber der Norm veränderte ADA-Aktivität festzustellen ist. Wir untersuchten auch bei den Kindern unserer Klinik mit malignen Tumoren die Erythrozyten auf ihre ADA-Aktivität, weil sich im Serum von Tumor-Patienten eine erhöhte ADA-Aktivität findet, wobei die quantitative Erhöhung in den einzelnen Studien stark schwankt (58).

Soweit wir die Eltern unserer Patienten mit Immunmangelerkrankungen erreichen konnten, wurden auch deren Erythrozyten untersucht. Eltern, deren Kind an einer Immunmangelerkrankung gestorben war, wurden von uns schriftlich ersucht, uns Blut für die Untersuchung zur Verfügung zu stellen. Ein Teil der angeschriebenen Eltern konnte auf diese Weise mit untersucht werden. Auch die Geschwister unserer Patienten und sonstige Blutsverwandte wurden einbezogen (Tab.1).

Tab.1 : Übersicht über die von uns untersuchten Patienten
und deren Verwandte:

Krankheit	Zahl der Fälle	Eltern, Geschwister, andere Verwandte d. Patienten
Azammaglobulinämie	2	-
Agammaglobulinämie	(2)	7
Dysgammaglobulinämie	1	3
Dysgammaglobulinämie	(1)	3
Hypogammaglobulinämie	1	3
T-Zelldefekt (unklassi- fiziert)	1	-
SCID und	4	5
SCID (nicht klassifiziert)		
Wiskott-Aldrich-Syndrom	3	-
SCID	(3)	15
Autoimmunerkrankungen	2	-
Leukämien	25	-
maligne Tumoren	9	-

(Zahlen in Klammern: verstorbene, nicht untersuchte
Kinder, deren Eltern und Geschwister untersucht
werden konnten.)

Untersuchungsmethode

Die ADA-Aktivität wird im optisch-enzymatischen Test bestimmt.

Dazu zentrifugiert man 2 ml heparinisiertes, venöses Blut 15 min bei 3000 U/min. Der Überstand wird verworfen. Die Erythrozyten werden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und jeweils 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert.

Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen werden die dicht gepackten Erythrozyten hämolysiert. Das Hämolysat wird mit 0,05 M Puffer, pH 7,5, im Verhältnis 1 : 5 verdünnt. Man stellt die Reaktionslösung her, die pro ml 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5, 0,1 ml Adenosinlösung (1 mg Adenosin/ml aqua dest.) und 0,02 U Xanthinoxidase (Boehringer) enthält.

Man pipettiert 2 ml der Reaktionslösung in eine Quarzküvette mit einer Küvettendicke von 10 mm. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 μ l Erythrozyten-Lysat gestartet. Man mißt gegen eine Vergleichsküvette, die Puffer und Xanthinoxidase enthält. Der Versuch wird bei 37°C durchgeführt. Unser Spektralphotometer war eine PMQ II. Zunächst wartet man 5 min lang die Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes ab und liest dann bei 293 nm die Extinktion ab. Anschließend wird die Küvette bei 37°C 10 min lang inkubiert und dann wird nochmals die Extinktion abgelesen. Die Zunahme der Extinktion erfolgt proportional der Harnsäurezunahme (38).

Alle Versuche werden doppelt ausgeführt.

Der Hb-Gehalt des Erythrozyten-Lysates wird nach der Cyanmethämoglobinmethode bestimmt.

Die Transformationslösung enthält pro Liter

200 mg Kaliumhexacyanoferrat

50 mg Kaliumcyanid

140 mg KH_2PO_4 (Kaliumdihydrophosphat)

0,5 ml Netzmittellösung

Man pipettiert zu 5 ml dieser Transformationslösung 0,02 ml des verdünnten Erythrozyten-Lysates, läßt die Reaktion 5 min lang ablaufen und liest die Extinktion dann bei 546 nm ab. Gemessen wird gegen reine Transformationslösung.

Berechnung des Hb-Gehaltes:

$$E \times 36,7 = \text{g Hb}/100 \text{ ml HämolySAT}$$

Die spezifische Aktivität der ADA wird in μ Mol des-aminierteres Adenosin/h/g Hb ausgedrückt. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\frac{E_{293}/h}{11,3} \times \frac{V_C}{V_H} \times \frac{100}{\text{Hb}} \quad (\mu\text{Mol/h/g Hb})$$

darin bedeutet:

11,3 den Extinktionskoeffizienten von
Harnsäure bei 293 nm

V_C das gesamte Küvettenvolumen

V_H das Volumen des zugeführten HämolySates

Hb die Hämoglobinkonzentration in Gramm
pro 100 ml HämolySAT.

Ergebnis

In den einzelnen Gruppen wurden folgende Werte für die spezifische ADA-Aktivität gefunden:

	Zahl	μ =Mittelwert	σ =Standardabweichung	Schwankungsbreite
Erwachsenen-Kontrollen	22	45,65	13,63	24,23-87,35
Kinder-Kontrollen	42	52,25	16,66	17,70-95,06
primäre ID	12	52,97	8,31	41,68-67,04
Pat.-Familien	36	48,21	15,57	28,85-87,38
Leukämien	25	60,23	22,35	20,15-129,98
maligne Tu.	9	53,48	19,56	21,64-85,11

Signifikante Unterschiede bestanden nicht zwischen den einzelnen Gruppen und den entsprechenden Kontrollgruppen, obwohl statistische Aussagen bei der geringen Fallzahl der Patienten nicht gemacht werden können. Ein Fall mit völlig ADA-freien Erythrozyten wurde nicht gefunden (Abb.8).

Bei einigen ID-Patienten konnte auswärts eine Elektrophorese zur Bestimmung des ADA-Phänotypen durchgeführt werden. Die untersuchten Fälle hatten alle den Phänotypen ADA₁. Die aufgetretenen großen Schwankungsbreiten kommen wahrscheinlich dadurch zustande, daß wir keinen Kompensationsschreiber zur Verfügung hatten und somit keine Möglichkeit bestand, die Extinktionszunahme kontinuierlich zu beobachten.

Diskussion

Um darzulegen, wie die vorliegende Studie zu verstehen ist, ist es notwendig, ausführlich zu beschreiben, welche Bedeutung dem Adenosin im Stoffwechsel zukommt; von besonderem Interesse erscheint uns, welche Folgen ADA-Mangel bzw. exogenes Adenosin auf die Proliferation der lymphoiden Zellen hat. Mit diesen Daten ist man in der Lage, einen Zusammenhang zwischen ADA-Mangel und Immundefizienz herzustellen.

Biochemie:

Aufbau, Umbau und Abbau von Adenosin (Abb.5)

Am Stoffwechsel der Purine sind zahlreiche Enzyme beteiligt, die deren de-novo-Synthese, Umbau und Abbau katalysieren. Bei der de-novo-Synthese wird aus den Grundbausteinen Ribose-5-Phosphorsäure und einigen Aminosäuren zunächst Inosinsäure als Muttersubstanz der Purinnukleotide synthetisiert. Daraus entstehen auf enzymatischem Weg Adenosin-5-phosphat (Adenylsäure) und Guanosin-5-phosphat (Guanylsäure).

Ein energiesparender Weg im Purinstoffwechsel ist der Aufbau zu den entsprechenden Ribonukleotidderivaten aus Produkten des Nukleinsäurekatabolismus und den mit der Nahrung aufgenommenen Purinen. Dabei wird mittels Adeninphosphoribosyltransferase Adenin und Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) zu AMP aufgebaut, bzw. es wird ebenfalls enzymatisch PRFP und Hypoxanthin, Guanin oder Xanthin zu IMP, GMP oder XMP oxidiert. Dieser Weg ist für Gewebe, die keine de-novo-Synthese von Purinen haben, besonders wichtig.

Das Hauptabbauprodukt der überschüssigen Purinbasen ist die Harnsäure, wobei die einzelnen Basen verschiedene Wege gehen; vom Guanosin wird zunächst die Ribose abgespalten, dann wird Guanin zu Xanthin desaminiert und zur Harnsäure oxidiert. Adenosin wird mit Hilfe der Adenosindesaminase zu Inosin desaminiert. Durch phosphorolytische Abspaltung der Ribose mit Nukleosid-

phosphorylase entsteht Hypoxanthin, das durch die Xanthinoxidase über Xanthin zu Harnsäure oxidiert wird (60, 56, 55, 20).

Adenosin kann in gewissem Umfang folgende Reaktionsfolge durchlaufen: Adenosin $\rightarrow$ Inosin $\rightarrow$ Hypoxanthin $\rightarrow$ Inosinmonophosphat $\rightarrow$ Adenosinmonophosphat $\rightarrow$ Adenosin. Sie wird als Adenosin-Zyklus bezeichnet (66, Abb. 5).

Bei exzessiver Desaminierung gehen dadurch Purine verloren (26). Adenosin kann auch mittels Adenosinkinase zu AMP phosphoryliert werden, das dann über ADP zu ATP phosphoryliert wird.

Folgen des ADA-Mangels

Fehlt in den Zellen ADA, wodurch eine Desaminierung nicht mehr möglich ist, wird die Adenosinkinase gesättigt, und es werden exzessiv große Mengen von Adenosin über AMP und ADP zu ATP phosphoryliert. Durch Experimente wurde gesichert, daß durch erhöhte intrazelluläre ATP-Konzentration die Entstehung von Uridin aus der Cotsäure, der Muttersubstanz der Pyrimidine, gehemmt wird. Auf diese Weise geht die Zelle durch Mangel an Pyrimidinen zugrunde (26).

Unter physiologischen Bedingungen entsteht Guanosin auf folgendem Weg: Adenosin $\rightarrow$ Inosin $\rightarrow$ Hypoxanthin $\rightarrow$ IMP $\rightarrow$ XMP $\rightarrow$ GMP $\rightarrow$ Guaninnukleotid. Steht ADA nicht zur Verfügung, so kommt es zu unzureichenden Konzentrationen von Guanylsäure für eine schnelle DNS- und RNS-Synthese (67).

Die Folgen exogenen Adenosins

Menschliches Serum enthält meßbare Konzentrationen von ADA, während Pferde-Serum ADA-frei ist. Das ermöglichte die Feststellung, daß Adenosin im desaminase-freien Serum toxisch auf die Proliferation der lymphoiden Zellen, insbesondere der T-Zellen wirkt. bereits in recht niedriger Konzentration tötet es die Zellen ab, in noch geringeren hemmt es deren Wachstum

und Proliferation. Fügt man diesem Medium Pyrimidine bei, so erholen sich die Zellen wieder und teilen sich trotz der Gegenwart von Adenosin; exogenes Adenosin interferiert also mit der zellulären Pyrimidin-Synthese.

Die Konzentration an ADA in den meisten anderen Zelltypen reicht nur für den Abbau endogenen, aber nicht **exogenen** Adenosins aus (27). Wenn Dünndarm-ADA fehlt oder nur in extrem niedriger Konzentration vorhanden ist, kommt es zu einer Erhöhung der Serum-ADA, die auf die Lymphozyten toxisch wirkt.

Lymphozyten haben wie Gehirnzellen, reife Erythrozyten, Blutplättchen (60) und Knochenmark (67) keine de-novo-Purin- und Pyrimidinsynthese; das sich bei ADA-Mangel anhäufende Adenosin verhindert den Aufbau von DNS und RNS; die Zellen gehen am Mangel an Pyrimidinen zugrunde. Im Gegensatz zu anderen schnell proliferierenden Zellsystemen sind die Lymphozyten von diesem Effekt besonders stark betroffen, wahrscheinlich, weil ihnen die AMP-Desaminase als Alternativweg fehlt (26). Möglicherweise unterscheidet sich die Regulation des Purinumbaus in den Lymphozyten oder in den Zellen, aus denen sie unmittelbar hervorgehen, in bisher unklarer Weise von dieser Regulation in anderen Zellen, so daß bei ihnen der Adenosin-Inosinblock die Zelldifferentiation oder Proliferation unterbindet.

Wie J.G.Hall (28) berichtet, ist die Produktion von Antikörperprotein durch die Plasmazellen verbunden mit einem Anstieg der Serum-ADA, was als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Funktion der Lymphozyten und der ADA gewertet werden kann.

ADA-Mangel und Immundefizienz

Bisher sind folgende "Inborn Errors of Metabolism" im menschlichen Purinstoffwechsel bekannt: (21)

De novo Purinsynthese	PRPP -Synthetase mutiert, Glutamin-PRPP-Aminotransferase mutiert
Umbau der Purine (Salvage Pathways)	Lesch-Nyhan-Syndrom partielle HG-PRT-Defizienz partielle A-PRT-Defizienz
Abbau der Purine	ADA-Defizienz bei CID Nukleosidphosphorylase (NP)-Defekt Xanthinurie erhöhte Xanthinoxidase

Bis jetzt ist nur im Fall der ADA-Defizienz ein Zusammenhang mit SCID gesichert. Obwohl sich der ADA-Mangel in allen Geweben manifestiert, sind die Lymphozyten davon am stärksten betroffen. Eine befriedigende Erklärung für dieses Phänomen ist bis heute nicht gegeben. Folgende Möglichkeiten werden diskutiert:

Unter physiologischen Bedingungen besitzen nur die Dünndarmzellen genügend ADA, um die durch die Nahrungsaufnahme bzw. die durch den physiologischen Zellabbau entstehenden Adenosinmengen abzubauen.

Früher wurde der Begriff "kombinierte Immundefizienz" ausschließlich auf zellulärer Ebene als Mangel an lymphoiden Vorläufer- oder Stammzellen definiert. Jetzt ist man im Falle einer mit ADA-Mangel kombinierten ID in der Lage, diese ID auf molekularer Ebene im Sinne eines Enzymdefektes zu definieren.

Im Mai 1975 berichtete E.R.Giblett erstmals von einem 5 Jahre alten Mädchen, in dessen Erythrozyten keine Nukleosidphosphorylase nachweisbar war. Es litt an schwerer Lymphopenie und hatte stark herabgesetzte Rosettenbildung der T-Zellen. Dies ist ein Hinweis, daß

auch andere Enzymdefekte das Immunsystem beeinflussen könnten (22).

Nachweismethoden von ADA in Erythrozyten

Qualitative Nachweismethoden

Die Blutproben werden wie für die Spektralphotometrie vorbereitet (siehe in "Untersuchungsmethode"). Es gibt verschiedene Methoden der Elektrophorese. Zuerst beschrieben und am häufigsten ausgeführt wurde die Stärkegelelektrophorese, die in einem Puffer von pH 6,5 bei 4°C 16-17 h waagrecht bei 3 - 3,5 V/cm ausgeführt wird. Gefärbt wird nach folgendem Prinzip (Abb.1):

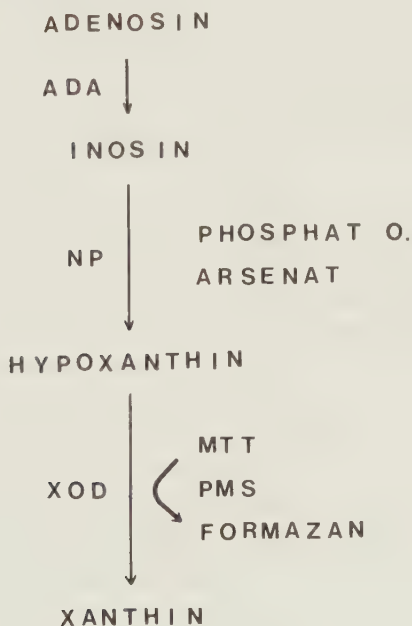


Abb.1: Färbemethode von ADA

Das mit Hilfe von ADA entstandene Inosin wird mittels beigefügter Nukleosidphosphorylase (NP) in Gegenwart von Phosphat oder Arsenat zu Hypoxanthin umgewandelt; durch Xanthinoxidase (XOD) wird es zu Xanthin oxidiert. In Gegenwart von Phenazinmethosulfat (PMS) ist diese Reaktion gekoppelt mit der Reduktion des Tetrazoliumsalzes (MTT) zu einem blauen, unlöslichen Niederschlag von Formazan.

In diesem Färbeansatz sind alle Komponenten unerlässlich selbst die in den Erythrozyten vorhandene NP, da sie in der Elektrophorese mit der ADA überlappt (81).

Von H.-H. Sonneborn (77,78) wurde eine Methode der Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folien beschrieben, die in einem Puffer pH 6,25 90 Minuten lang bei Raumtemperatur und 23 V/cm ausgeführt wird. Die Vorbereitung der Blutproben erfolgt wie bei der Stärkegelelektrophorese, die Färbung mit eben diesen Reagenzien, jedoch nach der Sandwich-Methode. Als Vorteil dieser Methode gilt, daß sie kürzer und leichter ausführbar ist als die aufwendigere Stärkegelelektrophorese, und daß sie wegen der Haltbarkeit der Folien besser zur Dokumentation geeignet ist.

Zu berücksichtigen ist, daß man je nach Trägermedium unterschiedliche Isoenzymmuster erhält.

Quantitative Nachweismethoden

Die Aktivität der ADA wird im optisch enzymatischen Test bestimmt. Es sind mehrere Tests beschrieben. Bei allen wird ein bestimmtes Zwischenprodukt aus dem Adenosin-Abbau bis zur Harnsäure gemessen (Abb.2, Abb.6). Die weit voneinander entfernt liegenden Absorptionsmaxima gestatten folgende Untersuchungsmethoden:

Direkte Methode: $\text{Adenosin} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{ADA}} \text{NH}_3 + \text{Inosin}$.
Man mißt bei 265 nm die Abnahme von Adenosin (43,6).
Der Nachteil dieser Methode ist, daß sie ziemlich ungenau ist.

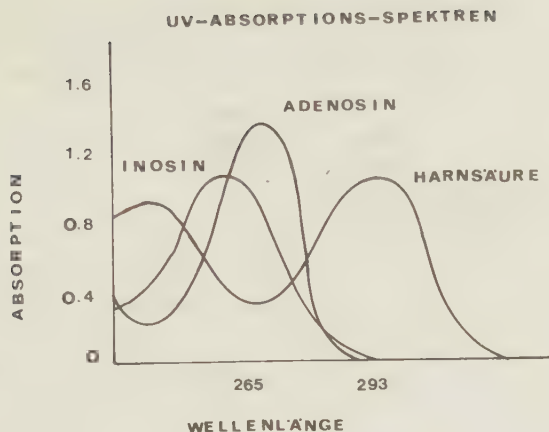


Abb.2: Absorptionsspektrum von Adenosin
und seinen Metaboliten

GDH (Glutaminsäuredehydrogenase) - Methode:



Hier wird in einer gekoppelten Reaktion der freigesetzte Ammoniak indirekt über die Abnahme von NADH bei 340 nm bestimmt. Der Nachteil der Methode ist, daß sich die Ergebnisse schon durch geringe Verunreinigungen des Ansatzes mit NH_3 verändern, und daß es sehr lang dauert, bis sich das Reaktionsgleichgewicht eingestellt hat.

ACD-Methode: Die dem Reaktionsansatz beigelegte Xanthinoxidase oxidiert Xanthin zu Harnsäure, die ihr Absorptionsmaximum bei 293 nm hat; deren Zunahme wird gemessen. Der Nachteil der Methode ist, daß zu große Adenosinkonzentration zur Substrathemmung führt, während zu geringe Adenosinkonzentration zu submaximaler Reaktionsgeschwindigkeit führt. Keine der drei Methoden

ist voll befriedigend; aber als praktische Labor-methode ist die XOD-Methode die, die bei den geringsten Fehlerquellen die zuverlässigsten Ergebnisse bringt (47).

Daten des Adenosindesaminasemoleküls

Vorkommen und Reaktionsbedingungen

ADA ist bei Mensch und Tier weitverbreitet. Umfangreiche Aktivitätsmessungen in verschiedenen menschlichen (18) und tierischen (7,9) Geweben ergaben besonders hohe Aktivitäten in Milz, Dünndarm und Erythrozyten, geringe in Leber, Niere, Hirn, Lunge, Herz und Skelettmuskulatur. Mit Hilfe der Zellfraktionierung wies H.Holmsen (37) ADA in den Blutkörperchen in der löslichen Fraktion nach. Über die subzelluläre Lokalisation in anderen Geweben ist nichts bekannt. Im Bereich zwischen 20°C und 35°C nimmt die Aktivität mit steigender Temperatur zu. Zwischen pH 6 und pH 8 hat ADA ein breites Aktivitätsmaximum. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} beeinträchtigen seine Wirkung nicht (87). Von den Reaktionsprodukten hemmt Inosin überhaupt nicht, Ammoniak verzögert durch Verschieben des pH nach der alkalischen Seite. Hemmend wirken Barium, Cadmium, Thallium, stärker Zink, Kupfer, Quecksilber und Silber (46,8).

ADA-Isoenzyme

In der Elektrophorese zeigt die Erythrozyten-ADA folgende Bandenmuster, wobei ADA_{1-1} , ADA_{2-1} und ADA_{2-2} jeweils im Blut verschiedener Spender gefunden wird (Abb.3). Jedes Muster besteht aus mindestens drei Isoenzymen. ADA_1 besteht aus drei Komponenten, die sich verschieden stark anfärben. Die ADA_2 - Komponenten wandern wesentlich langsamer als die der ADA_1 . ADA_{2-1} besteht aus vier Komponenten und stellt einen Mischtyp aus den beiden Haupttypen dar (81).

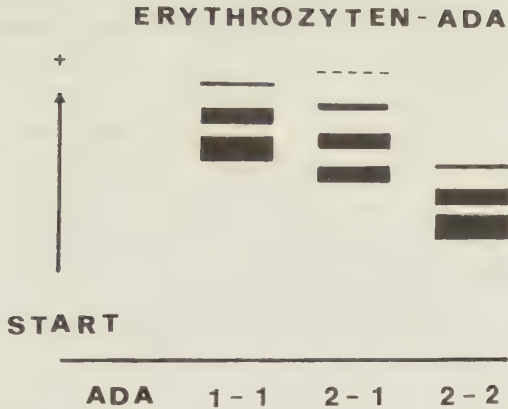


Abb.3: Schema der ADA-Isoenzyme in den Erythrozyten nach Wüst (94).

Molekulargewicht, Sulfhydrylgruppen, Konversionsfaktor
Mit der Gelfiltrationschromatographie wurde das Molekulargewicht der Erythrozyten-ADA auf 33 000 - 35 000 bestimmt. Das Molekulargewicht verschiedener gewebsspezifischer ADA-Isoenzyme variiert zwischen 280 000 und 440 000 (18). An Rinder-ADA wurde gezeigt, daß sie in der Ultrazentrifuge homogen ist und aus einer einzigen Polypeptidkette besteht (59).

Eine Untersuchung über die Aktivitäten der Phänotypen ADA₁ und ADA₂₋₁ zeigte, daß die Erythrozyten-ADA₁ signifikant höhere Werte hatte als der Mischtyp ADA₂₋₁ (4). Betrachtet man die Varianz aus allen in dieser Studie verwendeten Proben, so ergibt sich, daß nur 7% der gesamten Variationsbreite mit der genetischen Variation der verschiedenen ADA-Phänotypen erklärt werden können. Ungeklärt ist, von welchen Parametern der größere Teil der Variationsbreite herrührt; möglicherweise wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($V_{\max}$) in vivo durch die Versuchsbedingungen verändert, so daß eine andere $V_{\max}$ in vitro entsteht.

Oxydiertes Glutathion, Jodoacetat, Jodoacetamid und

Malat sind Substanzen, die mit freien Sulfhydrylgruppen (-SH) reagieren. Hopkinson et al. inkubierten Erythrozyten-ADA mit diesen Substanzen und verglichen die beobachteten mit den erwarteten Änderungen in Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit im elektrischen Feld. Es ergab sich kein Unterschied zwischen ADA₁- und ADA₂-Isoenzymen; jedes hat wenigstens eine freie reaktive Sulfhydrylgruppe (39). Die Aktivität von ADA wird durch äquimolare Inkubation mit PMB (p-Mercuribenzoat) fast völlig aufgehoben; vorläufig ist noch unklar, ob die -SH-Gruppe in funktioneller oder struktureller Hinsicht essentiell ist und an welcher Stelle sie sich im Molekül befindet (73).

Der Test auf Sulfhydrylgruppen zeigte, daß die in den verschiedenen Geweben vorhandene ADA mit der Molekülgröße der Erythrozyten-ADA durch Behandlung mit Thiol-Reagenzien ebenso wie diese verändert wurde, während die gewebsspezifische, höhermolekulare ADA dadurch nicht beeinflusst werden konnte (18).

Eine japanische Forschergruppe fand zuerst den Zusammenhang zwischen der nieder- und hochmolekularen gewebsspezifischen ADA heraus (2,3,61). Sie isolierten aus menschlicher Lunge einen "Konversionsfaktor", der die niedermolekulare ADA in die höhermolekulare Form umwandelt. R.Hirschhorn (33) gelang der Beweis, daß sich in allen Geweben, die spezifische ADA besitzen, ein Konversionsfaktor befindet. Bei der Konversion bleibt die Gesamt-Aktivität gleich. Es spricht einiges dafür, daß die größere ADA ein Polymer der kleineren ist oder ein Polymer plus ein zusätzliches Molekül (33,61).

Die genaue biologische Bedeutung dieses Konversionsfaktors ist noch unklar, möglicherweise liegt sie nur in seiner regulatorischen Wirkung: die kleinere ADA ist aktiver, aber weniger stabil, während die größere weniger aktiv, aber stabiler ist. Diese These wird durch Messungen an PHA-stimulierten Lymphozyten gestützt. Sie zeigen unter diesen Bedingungen verminderte spezifische, aber erhöhte unspezifische ADA-Aktivität, was

sich durch die wichtige Rolle, die ADA für die DNS- und RNS- Synthese bei Lymphozyten spielt, erklären läßt (31).

Genetische Aspekte

Multiple Bandenmuster der ADA

ADA zeigt Polymorphismus, d.h., sie existiert in zwei oder mehr vererbten Strukturformen mit Genfrequenzen, die höher liegen, als man durch Mutation allein erwarten müßte. Die häufigsten Varianten sind ADA₁ mit etwa 92%, ADA₂₋₁ mit etwa 8% und ADA₂ mit weniger als 1%. In Einzelfällen wurden folgende phänotypischen Varianten beschrieben, die in der Elektrophorese je ein besonderes Bandenmuster zeigten:

ADA ₃₋₁	(Dissing et al.	16)
	(Hopkinson et al.	38)
ADA ₃₋₂	(Hopkinson et al.	38)
ADA ₄₋₁	(Wüst	94)
ADA ₅₋₁	(Renninger	70)
	(Radam et al.	69)
ADA ₅₋₂	(Radam et al.	69)
ADA ₆₋₁	(Radam et al.	69)

Für die Entstehung dieser multiplen Banden gibt es vorläufig keine eindeutige Begründung; es kann sich dabei um genetisch bedingte verschiedene Primärstrukturen, multiple isomere Formen desselben Enzymmoleküls in Bezug auf Ladung, Größe, Konformation oder aber um Interaktion oder Artefakte handeln.

Die interessanteste Variante ist die von Hopkinson (38) beschriebene. Er fand Träger der ADA₃₋₁ in einer Familie mit zahlreichen Mitgliedern, konnte aber keinen Homozygoten für das Allel ADA₃₋₃ entdecken. Die Heterozygoten für ADA₃₋₁ zeigten reduzierte Aktivität.

Verteilung der Varianten ADA₁₋₁ und ADA₂₋₂ in verschiedenen ethnischen Gruppen

Um Material für Studien über die Genetik der ADA zu gewinnen, wurden die Erythrozyten zahlreicher Blutspender untersucht (Tab.2).

Ethnische Gruppe	Fall- zahl	ADA-Verteilung		Literatur
		ADA ₁	ADA ₂	
Neger(Moçambique)	140	1.00	0.00	70
Indianer	140	1.00	0.00	89
Orientalen	118	0.98	0.02	14
Neger,Seattle	186	0.98	0.02	14
Neger	300	0.97	0.03	38
Japaner	931	0.969	0.031	76
Neger	147	0.966	0.034	81
Prager	360	0.957	0.043	29
Amerikaner	168	0.95	0.05	14
Hessen	579	0.95	0.05	70
Engländer	1353	0.95	0.05	38
West-Berliner	500	0.942	0.058	50
Engländer	580	0.941	0.059	81
Dänen	1321	0.939	0.061	17
Chinesen	279	0.939	0.061	91
Wiener	250	0.938	0.062	96
Stuttgarter	435	0.938	0.062	79
Hamburger	861	0.936	0.064	25
Dänen	247	0.933	0.067	48
Österreicher	674	0.932	0.068	95
Freiburger (BRD)	302	0.924	0.076	83
Italiener	320	0.911	0.089	75
Griechen	314	0.91	0.09	14
Juden,Nordafrika	204	0.909	0.091	82
Türken	566	0.904	0.096	12
Ashkenazi	437	0.904	0.096	82
Inder	213	0.89	0.11	81
Araber	138	0.888	0.112	82
Malayen	325	0.885	0.115	91
Inder	460	0.88	0.12	38
Filipinos	100	0.88	0.12	14
Jemenit.Juden	219	0.865	0.135	82
Inder	340	0.853	0.147	91
Juden(Irak)	291	0.851	0.149	82

Tab.2:ADA-Verteilung in verschiedenen ethnischen Gruppen

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die Verteilung der ADA-Gene inhomogen ist. So ist das Gen für ADA₂ relativ selten bei den Indianern Südamerikas, bei Negern und Japanern. Hingegen hat es bei den Völkern des Mittelmeerraumes eine signifikant höhere Frequenz als bei den meisten anderen europäischen Völkern. Unklar ist, ob und welche Konsequenzen sich für die einzelnen Völker daraus ergeben, doch wahrscheinlich hat diese Verteilung der Gene keine besondere Bedeutung; man kann jedoch anhand der ADA₂-Frequenzen Studien über die Wanderung und Durchmischung einzelner Völker machen, wie Szeinberg et al. das für die Juden getan haben (82).

Erbgang der ADA

Um zu testen, nach welchen Regeln der Genetik die ADA vererbt wird, wurden zahlreiche Familienuntersuchungen (17,25,38,48,71,84,95) und eine Untersuchung an eineiigen und zweieiigen Zwillingen (80) durchgeführt.

Die beiden Phänotypen ADA₁ und ADA₂ werden kodominant vererbt. Der Typ ADA₁₋₂ ist somit der Mischtyp. Sieht man von den seltenen Ausnahmen ab, so müssen für ADA zwei Allele mit stark unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen. Da im ADA-Isoenzymmuster bisher keine Ausnahme von der geforderten Erbgregel gefunden wurde, da keine Genkoppelungen mit anderen Blutmerkmalen zu bestehen scheinen und da zudem die Methode der eindeutigen Darstellung der verschiedenen ADA-Varianten keine besonderen Schwierigkeiten verursacht, hat dieses System auch bei strittigen Abstammungsfragen praktische Bedeutung (70).

Genetik des ADA-Mangels

ADA-Mangel wird wie ein großer Teil der bekannten "inborn errors of metabolism" autosomal rezessiv vererbt und es gelten dafür dieselben Bedingungen (Abb.4).

AUTOSOMAL REZESSIVER ERBGANG

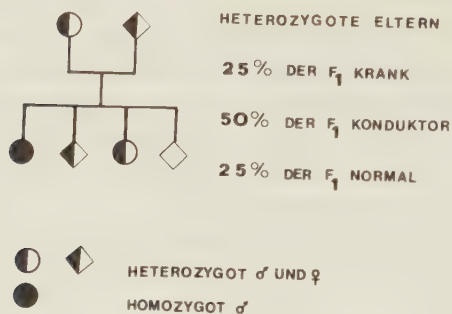


Abb.4: Schema des rezessiven Erbgangs

Wer ADA-defizient ist, stammt immer von heterozygoten Eltern ab, wie das Schema zeigt, und ist selbst homozygot für das entsprechende Allel.

Erwartungsgemäß stammt ein großer Teil der ADA-defizienten Kinder von blutsverwandten Eltern ab, bei denen die Inzidenz, für ein seltenes Allel heterozygot zu sein, höher ist als in der Normalbevölkerung (23,15,63,97). Als Beweis für die Heterozygotität der Eltern gilt, daß die Aktivität ihrer Erythrozyten-ADA in allen bekannten Fällen signifikant geringer war als in einer Vergleichspopulation.

"Stummes Allel"

Die These vom "stummen" Allel wurde von Chen et al. (11) aufgrund folgender Familienstudie aufgestellt: sie berichteten von einer Tochter, deren Erythrozyten-ADA den Phänotypen ADA_2 zeigte; ihre Mutter hatte ADA_1 , ihr Vater ADA_2 . Da diese Tochter nicht den nach den Mendel'schen Regeln zu erwartenden Mischtyp ADA_{1-2} hatte, mußte sie von ihrer Mutter ein "stummes" Allel, bezeichnet als ADA_0 , geerbt haben. Alle Mitglieder

dieser Familie, die als heterozygot für ADA_C gelten, zeigten in den Erythrozyten deutlich verminderte ADA-Aktivität.

Angewandt auf die Familien mit ADA-defizienten Mitgliedern besagt diese Theorie folgendes: die nicht miteinander blutsverwandten Eltern ADA-defizienter Kinder (23) sind heterozygot für das ADA_C-Gen, wobei deren ADA_C-Gene nicht notwendigerweise identisch sind. Bis jetzt ist keine Substanz entdeckt, die mit Sicherheit auf das ADA_C-Gen zurückzuführen ist, doch spricht einiges dafür, daß dieses Gen atypische, katalytisch wenig aktive oder völlig inaktive ADA kodiert, die mit den üblichen Nachweismethoden nicht erfaßt werden kann. Aus diesem Grund muß man vorläufig für die wahrscheinlich heterogene Population der ADA_C-Gene den Sammelbegriff beibehalten.

Zwei Tatsachen stützen die These vom "stummen" Allel, das atypische ADA codiert: in einigen Fällen konnte in Lymphozyten (63) bzw. auch in anderen Geweben (92) geringe ADA-Aktivität nachgewiesen werden, obwohl die Erythrozyten völlig frei von ADA waren. Ferner berichtete Jenkins (41) von einem 10 Jahre alten !Kung-Buben aus der Wüste Kalahari, dessen Erythrozyten sich bei wiederholten kontrollen als ADA-negativ erwiesen hatten; sein Vater und seine Schwester hatten verminderte ADA-Aktivität. Der Bub selbst war gesund und sein klinischer Befund war normal. Seine Plasma-Immunglobuline waren normal, periphere Lymphknoten waren nicht palpabel, er zeigte keine Reaktion vom verzögerten Typ gegen Candida, Streptokinase-Streptodornase und nur eine leichte Reaktion gegen Tuberkulin. Der Schick-Test war positiv. Dieser Bub gilt als homozygot für ADA_C; nach der oben genannten These produziert er atypische ADA. Zusammenfassend gilt, daß die Gruppe der ADA-negativen Menschen wahrscheinlich heteroger ist. Die Kinder blutsverwandter Eltern gelten als homozygot für dasselbe ADA_C-Gen, das in ihrer Familie vererbt wird, während die

kinder nicht verwandter Eltern als Träger zweier verschiedener ADA₀-Gene angesprochen werden. Mit dieser These läßt sich erklären, daß das klinische Bild ADA-negativer Patienten in sehr weiten Grenzen variiert.

Zahl der ADA-Allele und die chromosomale Lage der ADA-Gene

Bereits die ersten Berichte über ADA-negative Patienten, die an SCID litten, gaben zu der Vermutung Anlaß, daß beide seltenen Erscheinungen nicht zufällig zusammentreffen, sondern kausal miteinander verknüpft sein mußten. Zunächst war unklar, wieviele Genorte für ADA existierten; es wurde postuliert, daß jede gewebsspezifische ADA von einem eigenen Genort kodiert werden müsse (18). Erst der Nachweis des Konversionsfaktors von Hirschhorn bewies die Vermutung, daß nur zwei Allele für ADA existieren können (30,31).

Zunächst galt als wahrscheinlich, daß ADA, ebenso wie die Phosphoglucomutase (PGM), von demselben Chromosom kodiert wurde, auf dem sich der Genort für HL-A befindet (49). Familienstudien ließen diesen Zusammenhang als begründet erscheinen (19). Ferner sind die den HL-A analogen Genorte bei Meerschweinchen und Mäusen den Genorten, die die Immunabwehr kontrollieren, sehr eng benachbart (5). Diese beiden Tatsachen führten zu der Annahme, daß ADA ein Marker-Enzym für die Immundefizienz sein müßte. Erst durch die Zellhybridisierung gelang die Zuordnung von HL-A/PGM und ADA zu ihren Chromosomen. Diese Methode geht nach folgendem Prinzip: man läßt somatische Zellen von Nagetieren mit menschlichen Zellen zur Fusion kommen, wobei die Parentalzellen einen binukleären Heterokaryonten darstellen. Durch Mitose entstehen im allgemeinen mononukleäre oder hybride Tochterzellen, die von beiden Parentalzellen Chromosomen enthalten. Diese Hybriden werden zu großen klonalen Zellpopulationen gezüchtet, wobei meist ein unilateraler Verlust menschlicher Chromosomen statt-

findet. Oft behält man aber auch über zahlreiche Generationen hinweg die gleiche Art und Anzahl menschlicher Chromosomen. Durch Einbringen in Selektionsmedien werden die Klone auf An- oder Abwesenheit bestimmter Enzyme getestet. Dies erlaubt Rückschlüsse darauf, auf welchem Chromosom das Enzym liegt (72).

Mit dieser Methode wurde eindeutig bewiesen, daß HL-A mit seinem Marker PGM auf Chromosom 6 liegt (42); ebenso wurde die schon früher geäußerte Meinung, daß ADA auf Chromosom 20 liegen müsse, (90) bestätigt (13,85). Dies stützt die These, daß der ADA-Mangel auf dem oben beschriebenen biochemischen Weg sekundär zur Immundefizienz führt.

ADA-Mangel: Mutation - Deletion

Die These, daß es sich bei ADA-Mangel mit SCID um eine Deletion handeln könnte, wurde sowohl durch die Tatsache gestützt, daß beide seltenen Ereignisse bis auf eine einzige Ausnahme stets gemeinsam auftraten, als auch durch die Unkenntnis der chromosomalen Beziehung von HL-A und ADA. Eine Deletion konnte niemals durch Karyotypisierung bewiesen werden. Die Untersuchung der HL-A-Antigene der Heterozygoten einer Familie zeigte, daß diese Menschen den vollen Satz hatten. Im Falle einer Deletion dürften sie nur 2 Antigene besitzen (35).

Aufgrund der chromosomalen Lage kann ADA kein Marker-Enzym für das HL-A-System sein. Das häufige gemeinsame Auftreten von ADA-Mangel und SCID spricht für einen Kausalzusammenhang, wobei ADA-Mangel Voraussetzung für SCID ist und nicht umgekehrt, da es auch Immundefizienzen ohne ADA-Mangel gibt (53). Für eine Mutation spricht, daß die Gruppe der ADA-defizienten Patienten mit SCID heterogen ist und daß in einzelnen Fällen geringe gewebspezifische ADA-Aktivitäten nachgewiesen sind (64,92); die These, daß diese Aktivitäten von

Mikroorganismen herrühren, die in die entsprechenden Gewebe eingedrungen sind, muß als zu unwahrscheinlich abgelehnt werden (24).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bisher kein unumstößlicher Beweis für eine Mutation geführt wurde, daß sie nach den bis jetzt gewonnenen Erkenntnissen aber von allen Möglichkeiten die wahrscheinlichste ist.

Klinisch-pathologische Daten

Bei einem workshop, der 1973 in Albany, New York, abgehalten wurde, wurden Fälle mit CID ohne ADA-Mangel wie die autosomal rezessiv vererbte Ataxia teleangi-ektasia, ferner geschlechtsgebundene Formen der CID wie die X-chromosomale Agammaglobulinämie und das Wiskott-Aldrich-Syndrom, ferner sporadisch auftretende Formen der ID wie transitorische Hypogammaglobulinämie, Immundefizienzen mit Hypo-oder Dysgammaglobulinämie und unklassifizierte Formen der ID mit der mit ADA-Mangel kombinierten ID verglichen (Tab.3 und Tab.4).

Klinische Daten

Für die in die vorliegende Studie aufgenommenen Patienten wurden folgende Kriterien für die Diagnose CID verlangt, sofern es sich nicht um eine wohldefinierte ID wie Thymusaplasie, Wiskott-Aldrich-Syndrom usw. handelte: rezidivierende, schwere Infektionen im frühen Kindesalter und nicht normale Funktion der B- und T-Zellen (52).

Im klinischen Bild und im Krankheitsverlauf bestehen zwischen Patienten mit ADA-Mangel und solchen mit normaler ADA geringe, wenn überhaupt Unterschiede irgendeiner Art. CID manifestiert sich i.a. im Alter unter 6 Monaten, wobei größere Abweichungen vorkommen. Chronische Diarrhoe und Malabsorption, chronische Pneumonie und nicht infizierte Hautläsionen treten in

beiden Gruppen mit gleicher Frequenz auf. Rezidivierende Otitis media und Infektionen mit opportunistisch pathogenen Keimen kommen bei den ADA-Mangel-Patienten etwas häufiger vor. Gedeihstörung und Candidiasis kamen in beiden Gruppen vor, bereiteten in der ADA-normalen Gruppe aber die größeren Probleme. In allen Fällen fehlten Tonsillen und adenoides Gewebe. Palpable Lymphknoten sind selten vorhanden. Hepatosplenomegalie kam in der ADA-Mangel-Gruppe nur ein einziges Mal vor. Die Expressivität der klinischen Symptome schwankt in der ADA-negativen Gruppe in sehr viel stärkerem Umfang (88).

Labordaten

In Bezug auf die nichtimmunologischen Daten wurden keine Unterschiede in den beiden Gruppen festgestellt. In der ADA-negativen Gruppe waren mehr Patienten mit schwerem Mangel an B- und T-Zellen als in der ADA-positiven Gruppe. In der ADA-positiven Gruppe war besonders das B-Zellsystem ausgenommen, obwohl es Patienten mit nachweisbaren Restfunktionen des B- und T-Zellsystems in beiden Gruppen gab. In der ADA-negativen Gruppe hatte die Hälfte der Kinder überhaupt keine B- oder T-Zellfunktion, während in der ADA-positiven Gruppe die T-Zellfunktion bei allen Patienten zumindest in minimalem Umfang vorhanden war, während 6 von 9 Kindern auch eine geringe B-Zellfunktion zeigten (52). In beiden Gruppen gibt es also Patienten ohne nachweisbare B- und T-Zellfunktion und solche mit Restfunktionen.

Röntgenologische Daten

Auffällig ist, daß ADA-negative Patienten Abnormalitäten am Skelett aufweisen. Auf dem Kongreß in Albany wurden folgende Besonderheiten beschrieben: 9 Patienten, von denen 6 ADA-Mangel in den Erythrozyten hatten, zeigten

an der anterioren Knochen-knorpel-Grenze eine Konkavität, wobei die Rippen weitgestellt waren.

Nur bei 6 der oben genannten 9 Patienten konnte das Becken röntgenologisch beurteilt werden. In einem Fall war es normal, in den übrigen 5 Fällen war es in der Vertikalrichtung zu kurz und die Breite-Höhe-Relation entsprechend zu groß.

Anomalien im Gelenk von Proc.transversus und Rippe zeigten sich in 5 Fällen. Bei 4 Patienten mit ADA-Mangel waren die Wirbelkörper der Brust- und Lendenwirbelsäule zu kurz mit entsprechend vergrößerten Zwischenwirberräumen.

Vershmälerte wachstumsfugen als Zeichen der Stoffwechselstörung fanden sich bei 3 ADA-negativen Kindern.

2 ADA-negative Kinder zeigten zu große Strahlentransparenz in den Enden der Röhrenknochen (93).

Es ist also nicht möglich, daß nur auf Grund klinischer Daten ADA-positive von ADA-negativen ID sicher unterschieden werden können.

Pathologische Daten

Thymus: während der Thymus bei ADA-positiven Kindern mit CID keine Differentiation zwischen Kortex und Medulla zeigt und Hassall'sche Körperchen fehlen, zeigt er bei ADA-negativen Kindern folgende Besonderheiten: er bietet nicht das embryonale Bild, sondern zeigt nur starke Involution; Hassall'sche Körperchen sind vorhanden. Das Epithel ist in einem Teil der Fälle undifferenziert, in anderen Fällen kann es auch differenziert sein. Insgesamt wirkt der Thymus bei ADA-negativen Patienten normal, aber involviert. Milz, Lymphknoten, Gastrointestinaltrakt, Knochenmark und andere Organe der Patienten mit ADA-Mangel unterscheiden sich histologisch nicht von denen ADA-positiver Patienten (40).

Diagnostik, Klinik, Therapie der ID mit ADA-Mangel

Pränatale Diagnostik

In der Zeit, als man noch von der Annahme ausging, daß die Erythrozyten- und die gewebspezifische Form der ADA an verschiedenen Genorten kodiert würden, war die normale Erythrozyten-ADA als Parameter für den Nachweis einer ID mit ADA-Mangel in normalen Fibroblasten in Gewebekulturen nicht in allen untersuchten Fällen mit vergleichbarer Aktivität vorhanden. Daraus wurde gefolgert, daß wegen der Unzuverlässigkeit der Methode eine pränatale Diagnose "ADA-Mangel" nicht möglich sei (18).

Inzwischen gelang R.Hirschhorn und N.Beratis bei einem ADA-negativen Patienten der Beweis, daß bei ihm in den Fibroblasten nicht nur die Erythrozyten-ADA, sondern auch die gewebspezifische ADA fehlte. Ferner wurde bei Graviden, die in Bezug auf ADA unverdächtig waren, eine Amniocentese durchgeführt, und in den angelegten Fibroblastenkulturen ein Normwert für ADA ermittelt (32). In einer Familie, in der die Eltern und andere Familienmitglieder heterozygot für ADA waren, war bereits ein Kind an SCID gestorben. Als die Mutter erneut gravide war, wurde eine Amniocentese durchgeführt und in der Fibroblastenkultur die ADA-Aktivität bestimmt. Sie betrug weniger als 1,5% der normalen Kulturen. Die später durchgeführte Untersuchung der Erythrozyten des Kindes ergab, daß sie ADA-negativ waren (34).

Es ist also prinzipiell möglich, in Fällen, wo der Verdacht besteht, daß ein ADA-negatives, immundefizientes Kind geboren werden könnte, die Diagnose schon pränatal zu stellen und die notwendigen Maßnahmen rechtzeitig einzuleiten, bevor Komplikationen eintreten. Aufgrund dieses Tests ist es auch möglich, eine fundierte genetische Beratung durchzuführen.

Screening-Methode

Eine weitere Möglichkeit zur Früherkennung der ADA-negativen ID besteht in der von Moore et al.(57) entwickelten Screening-Methode. Dazu benötigt man einen Tropfen Blut, der auf Filterpapier aufgebracht wird wie bei dem Test auf Phenylketonurie. Dieses Filterpapier wird auf ein Gel aufgebracht, das die Reagenzien enthält. Das Prinzip des Tests besteht darin, daß in Gegenwart von ADA Ammonium aus Adenosin freigesetzt wird, wodurch sich das pH ändert; dies wird durch den Farbumschlag der im Gel befindlichen Indikatoren angezeigt (Abb.7). Bei diesem Test ist mit 1,7% falsch-positiven und mit 2,2% falsch-negativen Ergebnissen zu rechnen. Bei der Anwendung dieses Tests auf Neugeborene muß man mit folgenden möglichen Verfälschungen rechnen: mütterliches ADA-haltiges Serum ist placentargängig und kann somit im Blut des Kindes erscheinen, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte, ferner können mütterliche Erythrozyten im Blut des Kindes sein. Beide Möglichkeiten führen aber nur zu einer so geringen Erhöhung der ADA-Aktivität im kindlichen Blut, daß man wesentlich empfindlichere Tests entwickeln müßte, um sie nachzuweisen. Der Test gilt als hinreichend zuverlässig zum Auffinden ADA-negativer Neugeborener.

Es wäre wünschenswert, daß dieser Test in das Routine-Untersuchungsprogramm aller Neugeborenen aufgenommen wird, jedoch die Seltenheit der Erkrankung und die nicht unerheblichen Kosten dürften die Einführung dieses Tests bei uns verhindern.

Therapie

Bei den CID-ADA-negativen Patienten ist der T- bzw. B-Zelldefekt verschieden stark ausgeprägt; auch die anderen Gewebe wie Knochen oder Niere sind unterschiedlich stark betroffen. In dieser Hinsicht spielt möglicherweise der mütterliche Einfluß auf den Feten eine Rolle;

denn da die Mütter ADA-negativer Kinder selbst reduzierte ADA-Aktivität haben, ist eine Störung des fetalen Aufbaus des Immunsystems anzunehmen. Es spricht viel dafür, daß der Enzymmangel bereits lange vor der Geburt seine Wirkungen entfaltet. Es scheint ein Zusammenhang zu bestehen zwischen dem Enzymmangel des Feten, der zu geringen Enzymaktivität der Mutter und anderen Einflüssen. Das alles führt zu der unterschiedlichen Ausbildung des Thymus (65).

Die Therapie der mit ADA-Mangel kombinierten ID erfolgt wie bei anderen Immundefizienzen durch den Versuch, dem Patienten entwicklungsfähige, immunkompetente Zellen zu transplantieren.

Es wurden folgende Methoden beschrieben:

Knochenmarktransplantation: diese Methode ist auf Patienten beschränkt, für die ein in Bezug auf das HL-A-System passender Spender gefunden werden kann, da sonst eine Graft-versus-host-Reaktion einsetzt (63,51).

Diese Methode wird am häufigsten angewandt.

Implantation fetaler Gewebe: während der späten Embryonalzeit differenzieren und proliferieren die hämatopoetischen Stammzellen, die sich zu dieser Zeit in der Leber befinden. Vor der 18. Schwangerschaftswoche haben diese Stammzellen keine immunologische Kompetenz (36). In Fällen, in denen eine Knochenmarktransplantation nicht möglich war, wurde teilweise mit Erfolg fetale Leber transplantiert und so der Aufbau des Immunsystems erreicht, sowohl bei ADA-negativer SCID (45), als auch bei ADA-positiver SCID (10).

Es wird von einem Fall berichtet, wo fetale Leber zusammen mit fetalem Thymus transplantiert wurde (23).

Einen Ansatz zu einer ausschließlich auf ADA-negative Immundefizienzen beschränkte therapeutische Möglichkeit bietet die Beobachtung von Polmar et al. (68). Die Lymphozyten ADA-negativer Patienten mit SCID proliferieren bei Zugabe der üblichen Mitogene nur

unzureichend, wenn überhaupt. Gibt man in das Medium aber ADA, so proliferieren sie unter der Einwirkung der Mitogene wesentlich stärker. Diese in vitro gemachte Beobachtung wurde an einem Patienten getestet. Man ersetzte die nicht vorhandene ADA durch Transfusion gefrorener Erythrozyten, die reichlich ADA enthalten, worauf die ADA-Aktivität im Blut deutlich anstieg und auch über zwei Wochen erhöht blieb. Die Lymphozyten proliferierten und erreichten normale Mengen, während sich zusätzlich ein röntgenologisch nachweisbarer Thymusschatten entwickelte.

Möglicherweise bietet sich hiermit eine für ADA-negative SCID spezifische Kausaltherapie an. Trotz der bereits gewonnenen Erkenntnisse über den Zusammenhang von ADA-Mangel und SCID bleiben doch noch viele Fragen unbeantwortet, während neue Aspekte gefunden werden. So legt eine Arbeit von Trotta et al. (86) die Vermutung nahe, daß es sich bei ADA-Mangel gar nicht um einen ererbten Enzymmangel handelt, sondern vielmehr um einen ererbten Inhibitor der ADA. Es bleibt künftigen Arbeiten überlassen, diese Frage mit allen sich daraus ergebenden Konsequenzen zu erörtern.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurden die Erythrozyten von 12 Patienten mit verschiedenen Formen von Immunmangelerscheinungen, darunter 4 Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID), von 2 Patienten mit Autoimmunerkrankungen, von 25 Patienten mit Leukämie, von 9 Patienten mit malignen Tumoren und von 36 Angehörigen von Patienten, die bereits vor Beginn der Studie an einem Immundefekt verstorben waren, sowie von 22 gesunden Erwachsenen und 42 gesunden Kindern zur Kontrolle auf ihren Gehalt an Adenosin-desaminase (ADA) untersucht. Wir verwendeten die Xanthinoxidase (XOD)-Methode nach Hopkinson et al. (38). Weil uns die technischen Voraussetzungen fehlten, war es nicht möglich, die Extinktionskurve kontinuierlich zeichnen zu lassen. Wir bestimmten daher einzelne Punkte auf der Geraden und berechneten daraus ihre Steigung (siehe S.10).

Der Mittelwert der ADA-Aktivität lag bei den Kontrollpersonen bei 46 ± 14 (Erwachsene) bzw. 52 ± 17 (Kinder). Bei den Patienten mit primärer Immundefizienz (ID) lag der Mittelwert bei 53 ± 8 , bei denen mit Leukämie bei 60 ± 22 , bei denen mit malignen Tumoren lag er bei 54 ± 20 . Bei den untersuchten Verwandten der Patienten ergab sich ein Mittelwert von 48 ± 16 . Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bestehen also nicht. Die in der Literatur angegebenen Mittelwerte für gesunde Personen (1,34,38,74) liegen zwischen 36 ± 6 bei Chen et al. (11) und 100 (95% der Werte zwischen 59 und 171) bei Parkman et al. (63).

Trotz der umfangreichen Untersuchungen an insgesamt 48 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, bei

denen ein ADA-Mangel denkbar war, fand sich keiner mit ADA-Mangel oder extrem niedrigen ADA-Werten. So weist auch die vorliegende Studie auf das seltene Auftreten dieses Enzymmangels hin.

Im Zusammenhang mit den vorliegenden Ergebnissen werden die wichtigsten Funktionen der ADA im Metabolismus beschrieben, um die Besonderheiten der ADA-negativen SCID zu erläutern (siehe S.13 ff). ADA kommt in verschiedenen Isoenzymen vor, wobei die beiden häufigsten, ADA₁ und ADA₂ genetisch kodiert sind und kodominant vererbt werden. ADA-Mangel wird autosomal-rezessiv vererbt.

ADA-Mangel und ID hängen kausal zusammen. Das gleichzeitige Auftreten von SCID und ADA-Mangel stellt ein eigenes Krankheitsbild dar, das klinisch von anderen ID aber nicht abgegrenzt werden kann.

Man kann ADA pränatal aus den Fibroblasten bestimmen, die durch Amniocentese gewonnen werden können. Eine Screening-Methode zur Ermittlung ADA-negativer Säuglinge wurde von Moore et al.(57) entwickelt. Da bei ADA-negativer SCID der ADA-Mangel als ursächlich für die SCID anzusehen ist, bietet sich bei dieser Krankheit über die übliche Therapie primärer ID hinaus die Möglichkeit, durch Substitution das fehlende Enzym zu ersetzen und so für eine bessere Abwehrlage zu sorgen.

Tab.3: ADA-Mangel bei primären Immundefizienzen

Diagnose	unter- suchte Fälle	eigene Be- obachtung	ADA-Mangel nachgewies.	Lit.
schwere kombi- nierte ID	26	4	15/30	15,62, 63,23, 45,1, 86
unklassif.T- Zell-Defekt	-	1	0/1	54
X-chromosomale Agammaglobulin- ämie	1	-	0/1	54
versch.Formen v.Dysgamma- globulinämie	4	1	0/5	54
transit.Hypo- gammaglobulin- ämie	4	2	0/6	54
selektiver Ig A-Mangel	2	-	0/2	54
Wiskott-Aldrich- Syndrom	2	3	0/5	54
Ataxia tele- angiektasia	2	-	0/2	54
Dysphagozytose	2	1	0/3	54
gesamt	43	12	15/55	

Tab.4: Schicksal der Patienten mit ADA-negativer SCID

- Patientin K.S.: Hospitalisierung mit 22 Monaten. Transplantation von fetalem Thymus und fetaler Leber. Exitus (23).
- Patientin T.H.: CID von Geburt an. Dreimal Transplantation mit dem Knochenmark der Mutter, das nicht HL-A-identisch war. Drei Monate nach der Transplantation gutes Befinden, später Exitus (55,23,51).
- Patient M.R.: Im Alter von einem Monat Diagnose: ADA-negative SCID. Da kein passender Spender von Knochenmark gefunden werden konnte, wurde die Leber eines 8,5 Wochen alten Feten transplantiert. Ein Jahr lang Patient bei gutem Befinden. Dann Entwicklung eines nephrotischen Syndroms. Immunkomplexnephritis.Exitus.
autopsiebefund: Thymus wog mehr als 1 Gramm.Zahl der Zellen im Knochenmark normal (45).
- Patient P.K.: Exitus im Jahr 1973. Eltern blutsverwandt (1).
- Patientin S.C.: Eltern nicht blutsverwandt. Im Alter von etwa 5 Monaten Implantation fetaler Leber. 18 Monate nach der Transplantation Patientin bei gutem Befinden (1).
- Patientin M.J.: Diagnose gestellt im Alter von 6 Monaten. Einige Monate später Exitus (15).
- Patient J.F.: Hospitalisierung im Alter von 3 Wochen. Keine Therapie. Exitus im Alter von 9 Wochen (62,97,74,11).
- Patientin J.B.: Hospitalisierung wegen chronischer Pneumonien. Knochenmarktransplantation mit HL-A-identischem Spendermark (Bruder der Patientin). Patientin war bis zur 23.

Woche nach der Transplantation bei gutem Befinden, dann Rückfall wegen Pneumocystis carinii-Infektion der Lunge. 11 Wochen später Entlassung aus dem Krankenhaus. 43 Wochen nach der Transplantation Patientin bei gutem Befinden (63).

Patient A.W.: Hospitalisierung im Alter von 4 Monaten wegen SCID. Knochenmarktransplantation mit dem Mark der Schwester des Patienten. 41 Monate nach der Transplantation Patient bei guter Gesundheit (63).

Patientin W.W.: Schwester von Pat.A.W. Hospitalisierung im Alter von 6 Wochen. Transplantation HL-A-identischen Knochenmarks mit 7 Wochen. Danach 1 Monat kein Zeichen einer Graft-versus-host-Reaktion. Mit 11 Wochen erneute Transplantation, von da ab Absinken der Lymphozyten. Mit 19 Wochen erneut Transplantation. Exitus 9 Tage später (63).

Patientin von : rezidivierende Infektionen ab 10 Wochen.
Dr.Good 1971 Diagnose SCID. Sieben Knochenmarktransplantationen. Hinreichende Entwicklung des Immunsystems (86).

Patient von : 1974 im Alter von 5 Wochen Diagnose SCID.
Dr.Good Kein Thymusschatten, Lymphopenie, verminderte Lymphozyten. 4 Knochenmarktransplantationen. Aufbau eines Immunsystems (86).

Patient von : in der 28. Schwangerschaftswoche Amnio-
Dr.Hirschhorn centese. In den kultivierten Zellen keine ADA-Aktivität. SCID. Mit 3 Monaten Serumwerte von IgG, IgA, IgM unter den Normalspiegel gesunken (34,68).

Der Patient wurde auf dem Workshop nicht vorgestellt. Von 2 weiteren vorgestellten Patienten sind keine Angaben ihrer Krankengeschichte veröffentlicht.

Abb. 5: Stoffwechselübersicht; die Rolle des Adenosins im Purinstoffwechsel. Die stark gezeichneten Pfeile kennzeichnen den Adenosinzyklus (siehe Text) (55). (ADA=Adenosindesaminase; AMP=Adenosinmonophosphat; IMP=Inosinmonophosphat; XMP=Xanthosinmonophosphat; GMF=Guanosinmonophosphat; DNS=Desoxyribonukleinsäure; RNS=Ribonukleinsäure)

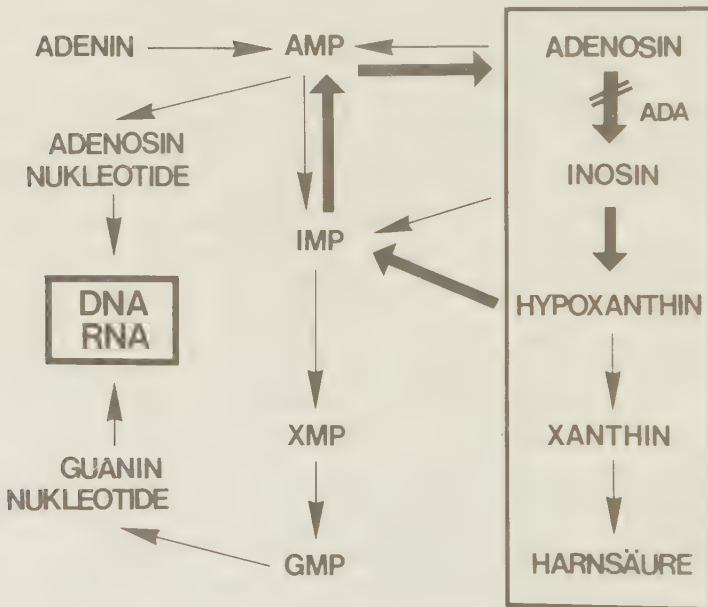


Abb. 6: Abbauweg von Adenosin
bei der spektralphoto-
metrischen Bestimmung

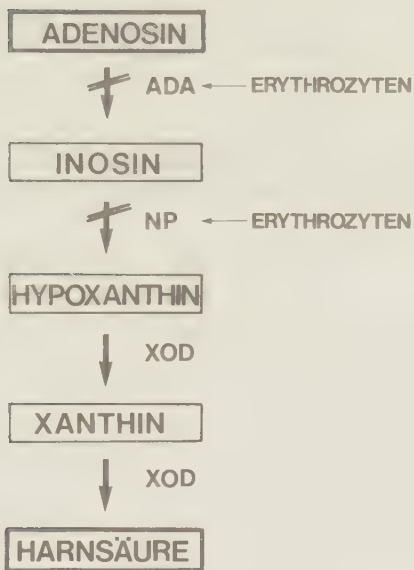


Abb. 7: Schema der Screening-Methode
nach Moore (57)

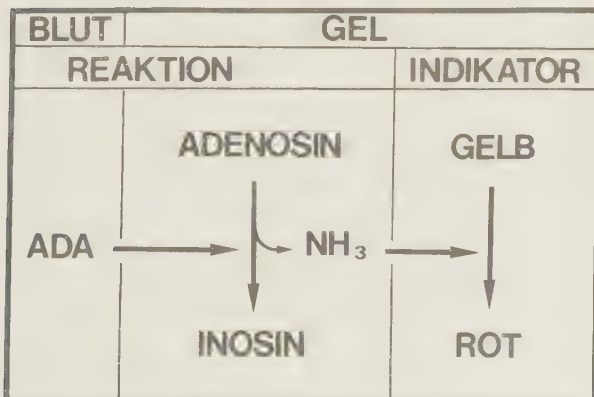
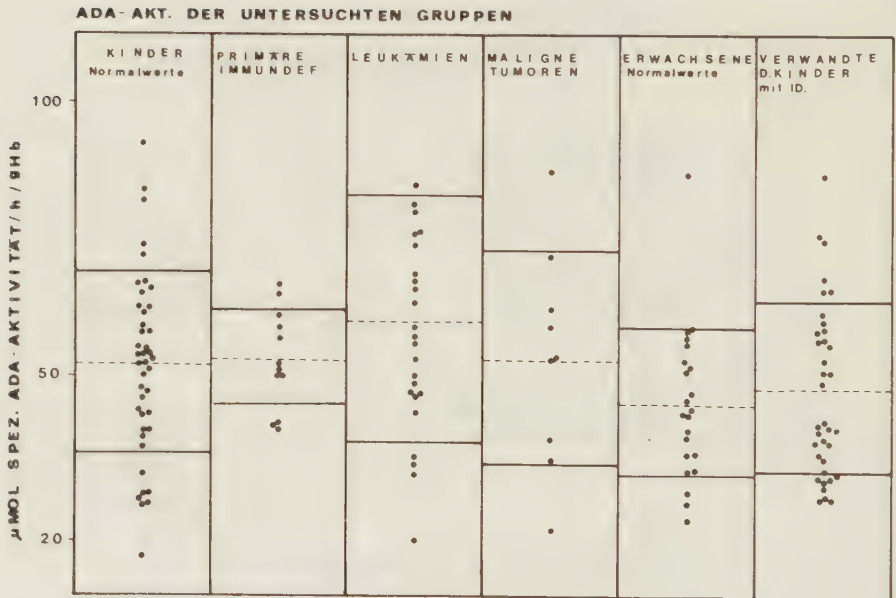


Abb. 8: ADA-Aktivität in den Erythrozyten normaler Kinder, normaler Erwachsener sowie von Kindern mit primären Immundefizienzen, Leukämien und malignen Tumoren.



Literatur

- 1 Akeret C., Plüss H.J., Hitzig W.H.: Hereditary severe combined immunodeficiency and adenosine deaminase deficiency. *Ped. Res.* 10, 67 (1976).
- 2 Akedo H., Nishihara H., Shinkai K., Komatsu K.: Adenosine deaminase of two different molecular sizes in human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 212, 25 (1974).
- 3 Akedo H., Nishihara H., Shinkai K., Komatsu K., Ishikawa S.: Multiple forms of human adenosine deaminase I. Purification and Characterization of two molecular species. *Biochim. Biophys. Acta* 276, 257 (1972).
- 4 Battistuzzi G., Scozzari R., Santolamazza P., Terrenato L., Modiano G.: Comparative activity of red cell adenosine deaminase allelic forms. *Nature*, 251, 25 (1974).
- 5 Benacerraf B., Mc Devitt H.O.: Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 175, 273 (1972).
- 6 Bergmeyer H.U., Gawehn K., Grassl M. (1974) in: *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer H.U., ed.) pp. 455, 456, 522, 557, 558; Verlag Chemie, Weinheim.
- 7 Brady T.G., O'Connell W.: A purification of adenosine deaminase from the superficial mucosa of calf intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 62, 216 (1962).
- 8 Brady T.: Adenosine deaminase. *Bioch. J.* 36, 478 (1942).
- 9 Brady T.G., O'Donovan C.I.: A study of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species. *Comp. Biochem. Physiol.* 14, 101 (1965).
- 10 Buckley R.H., Whisnant J.K., Schiff R.J., Gilbertsen R.B., Huang A.T., Platt M.S.: Fetal liver transplantation in severe combined immunodeficiency. In press.

- 11 Chen S.-H., Scott C.R., Giblett E.R.: Adenosine deaminase: Demonstration of a "silent" gene associated with combined immunodeficiency disease. *Amer. J. Hum. Gen.* 26, 103 (1974).
- 12 Cigdem A., Say B., Ergül T.: Frequency of red cell adenosine deaminase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in a sample of the Turkish population. *Hum. Her.* 24, 306 (1974).
- 13 Creagan R.P., Tischfield J.A., Nichols E.A., Ruddle F.H.: Autosomal assignment of the gene for the form of adenosine deaminase which is deficient in patients with combined immunodeficiency syndrome. *Lancet* II, 1449 (1973).
- 14 Detter J.C., Stamatoyannopoulos G., Giblett E.R., Motulsky A.G.: Adenosine deaminase. Racial distribution and report of a new phenotype. *J. med. Gen.* 7, 356 (1970).
- 15 Dissing J., Knudsen J.B.: Adenosine deaminase deficiency and combined immunodeficiency syndrome. *Lancet* II, 1316 (1972).
- 16 Dissing J., Knudsen J.B.: A new red cell adenosine deaminase phenotype in man. *Hum. Her.* 19, 375 (1969).
- 17 Dissing J., Knudsen J.B.: Human erythrocyte adenosine deaminase polymorphism in Denmark. *Hum. Her.* 20, 178 (1970).
- 18 Edwards Y.H., Hopkinson D.A., Harris H.: Adenosine deaminase isozymes in human tissues. *Ann. Hum. Genet.* 35, 207 (1971).
- 19 Edwards J.H., Allen F.H., Glenn K.P., Lamm L.U., Robson E.B.: The linkage relationship of HL-A. Copenhagen, p. 745 (1972). in: *Histocompatibility testing, 1972*; edited by J.Dausset and J.Colombani.

- 20 Fox J.H.: Human purine metabolism, in: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency a molecular defect. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London (1974), p. 49.
- 21 Fox, J.H.: Human purine metabolism. *ibid.*, p.46.
- 22 Giblett E.R., Ammann A.J., Wara D.W., Sandman R., Diamond L.K.: Nucleoside-phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. *Lancet*, May, 1010 (1975).
- 23 Giblett E.R., Anderson J.E., Cohen F., Pollara B., Meuwissen H.J.: Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet*, November, 1067 (1972).
- 24 Giblett E.R. : Genetic aspects, in: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency a molecular defect. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London (1974), p. 243.
- 25 Goedde H.W., Benkmann H.G., Christ I., Singh S., Hirth L.: Gene frequencies of red cell adenosine deaminase, adenylate kinase, phosphoglucomutase, acid phosphatase and serum α 1-antitrypsin (Pi) in a german population. *Humangenetik* 10, 235 (1970).
- 26 Green H., Chan T.-S.: Pyrimidine starvation induced by adenosine in fibroblasts and lymphoid cells: role of adenosine deaminase. *Science* 182, 836 (1973).
- 27 Green H.: Pyrimidine starvation induced by adenosine in cultured cells and its bearing on the lymphocyte deficiency disease associated with absence of ADA, in: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency a molecular defect. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London (1974), p 150.
- 28 Hall J.: Adenosine deaminase activity in lymphoid cells during antibody production. *Austral. J. exp. Biol.* 41, 93 (1963).

- 29 Herzog P., Bohatová J.: Phenotype and gene frequencies of adenosine deaminase in Prague. *Humangenetik* 17, 173 (1973).
- 30 Hirschhorn R., Levytska V., Meuwissen H.J., Pollara B.: Evidence for control of several different tissue-specific isozymes of adenosine deaminase by a single genetic locus. *Nature New Biol.* 246, 200 (1973).
- 31 Hirschhorn R., Levytska V.: Alterations in isozymes of adenosine deaminase during stimulation of human peripheral blood lymphocytes. *Cell. Immun.* 12, 387 (1974).
- 32 Hirschhorn R., Beratis N.G.: Severe combined immunodeficiency and adenosine deaminase deficiency. *Lancet* II, 1217 (1973).
- 33 Hirschhorn R.: Conversion of human erythrocyte adenosine deaminase activity to different tissue-specific isozymes. *J. Clin. Invest.* 55, 661 (1975).
- 34 Hirschhorn R., Beratis N., Rosen F.S., Parkman R., Stern R., Polmar S.: Adenosine deaminase deficiency in a child diagnosed prenatally. *Lancet* II, 73 (1975).
- 35 Hirschhorn K.: Overview in: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency a molecular defect. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London (1974), p. 308.
- 36 Hitzig W.H.: Immunodeficiency diseases : Functional classification. *Boll. Istit. Sierot. Mil.* 53, 235 (1974).
- 37 Holmsen H., Day H.J., Pimentel M.A.: Adenine nucleotide metabolism of blood platelets and sub-cellular localization of some related enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 186, 244 (1969).
- 38 Hopkinson D.A., Cook P.J.L., Harris H.: Further data on the adenosine deaminase (ADA) polymorphism and a report of a new phenotype. *Ann. Hum. Genet.* 32, 361 (1969).

- 39 Hopkinson D.A., Harris H.: The investigation of reactive sulphhydryls in enzymes and their variants by starch gel electrophoresis. Studies on red cell adenosine deaminase. *Ann. Hum. Genet.* 32, 81 (1969).
- 40 Huber J., Kersey J.: Pathological findings, in: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency a molecular defect. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London (1974).
- 41 Jenkins T.: Red blood cell adenosine deaminase deficiency in a "healthy" !Kung individual. *Lancet*, September, 736 (1973).
- 42 Jongsma A., van Someren H., Westerveld A., Hagemeyer A., Pearson P.: Localization of genes on human chromosomes by studies of human-chinese hamster somatic cell hybrids. *Humangenetik* 20, 195 (1973).
- 43 Kalckar H.M.; *J. Biol. Chem.* 167, 435 (1947).
- 44 Keightley R.G., Lawton A.R., Cooper M.D.: Developmental defects of T and B cell lines in humans. *Transplant. Rev.* 16, 15 (1973).
- 45 Keightley R.G., Lawton A.R., Cooper M.D.: Successful fetal liver transplantation in a child with severe combined immunodeficiency. *Lancet* II, 850 (1975).
- 46 Klein W.: Adenosin-desaminase und ihre Verwendung zur präparativen Inosindarstellung. *Hoppe-Seyler. Z.* 324, 163 (1961).
- 47 Körber W., Meisterernst E.B., Hermann G.: Quantitative measurement of adenosine deaminase from human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta* 63, 323 (1975).
- 48 Lamm L.U.: A study of red cell adenosine deaminase (ADA) types in 116 Danish families. *Hum. Her.* 21, 63 (1971).
- 49 Lamm L.U., Svejgaard A., Kissmeyer-Nielsen F.: PGM₃: HL-A is another linkage in man. *Nature New Biology* 231, 109 (1971).

- 50 Lefèvre H., Niebuhr R.: Polymorphismus der Adenosin-desaminase. Humangenetik 10, 88 (1970).
- 51 Meuwissen H.J., Moore E., Pollara B.: Maternal marrow transplant in a patient with combined immune deficiency disease (CID) and adenosine deaminase (ADA) deficiency. Ped. Res. 7, 362 (1973).
- 52 Meuwissen H.J., Pollara B., Pickering R.J.: Combined immunodeficiency disease associated with adenosine deaminase deficiency. J. Ped. 86, 169 (1975).
- 53 Meuwissen H.J., Pollara B.: Adenosine deaminase deficiency: The first inborn error of metabolism noted in immunodeficiency disease. J. Ped. 84, 315 (1974).
- 54 Meuwissen H.J., Pickering R.J., Moore E.C., Pollara B.: Impairment of ADA activity in combined immunological deficiency disease, in: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency a molecular defect. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London (1974), p. 79.
- 55 Meuwissen H.J., Pickering R.J., Pollara B.: Adenosine deaminase deficiency in combined immunologic deficiency disease. Birth Defects 11, 117 (1975).
- 56 Meyskens F.L., Williams H.E.: Adenosine metabolism in human erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 240, 170 (1971).
- 57 Moore E.C., Meuwissen H.J.: Screening for ADA deficiency. J. Ped. 85, 802 (1974).
- 58 Müller-Beissenhirtz W., Keller H.: Die Bestimmung der Adenosindesaminase im Serum. Dtsch. med. Wschr. 91, 159 (1966).
- 59 Murphy P.M., Noonan M., Collins P., Tully E., Brady T.G.: Preparative isolation of the isozymes of adenosine deaminase from bovine mucosa by ion-exchange chromatography. Biochim. Biophys. Acta 171, 157 (1968).

- 60 Murray A.W.: The biological significance of purine salvage. *Ann. Rev. Biochem.* 773, 811 (1971).
- 61 Nishihara H., Ishikawa S., Shinkai K., Akedo H.: Multiple forms of human adenosine deaminase II. Isolation and properties of a conversion factor from human lung. *Biochim. Biophys. Acta* 302, 429 (1973).
- 62 Ochs H.D., Yount J.E., Giblett E.R.: Adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiency syndrome. *Lancet* I, 1393 (1973).
- 63 Parkman R., Gelfand E.W., Rosen F.S., Sanderson A., Hirschhorn R.: Severe combined immunodeficiency and adenosine deaminase deficiency. *New Eng. J. Med.* 292, 714 (1975).
- 64 Pollara B., Meuwissen H.J.: Combined immunodeficiency disease and ADA deficiency. *Lancet* II, 1324 (1973).
- 65 Pollara B.: Adenosine deaminase and lymphocyte function; biological and biochemical considerations, in: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency a molecular defect. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London (1974). p. 130.
- 66 Pollara B.: ADA and lymphocyte function; biological and biochemical considerations. *ibid.* p. 131.
- 67 Pollara B., Moore J.J., Pickering R.J., Gabrielsen A.E., Meuwissen H.J.: Combined immunodeficiency disease: an inborn error of purine metabolism. *Birth Defects* 11, 120 (1975).
- 68 Polmar S.H., Wetzler E.M., Hirschhorn R.: Restoration of in-vitro lymphocyte responses with exogenous adenosine deaminase in a patient with severe combined immunodeficiency. *Lancet* II, 743 (1975).

- 69 Radam G., Strauch H.: Zur Differenzierung der Varianten 5-1 und 6-1 im Adenosindesaminase-Polymorphismus. Nachweis des neuen Phänotyps ADA 5-2 in der CSSR. Humangenetik 26, 151 (1975).
- 70 Renninger W., Bimbose Ch.: Zur Genetik der Erythrozyten Adenosindesaminase. Humangenetik 9, 34 (1970).
- 71 Ritter H., Wendt G.G., Tariverdian G., Zilch J., Rube M., Kirchberg G.: Genetics and linkage analysis of adenosine deaminase. Humangenetik 14, 69 (1971).
- 72 Ruddle F.H.: Linkage analysis in man by somatic cell genetics. Nature 242, 165 (1973).
- 73 Ronca G., Bauer C., Rossi C.A.: Role of sulphhydryl groups in adenosine deaminase. European J.Biochem. 1, 434 (1967).
- 74 Scott C.R., Chen S.-H., Giblett E.R.: Detection of the carrier state in combined immunodeficiency disease associated with adenosine deaminase deficiency. J. Clin. Invest. 53, 1194 (1974).
- 75 Scozzari R., Santolamazza C., Carapella E.: Studies on the red cell adenosine deaminase polymorphism in Rome. Humangenetik 8, 364 (1970).
- 76 Shinoda T.: Polymorphism of red cell adenosine deaminase in the Japanese population. Jap. J. Genet. 45, 147 (1970).
- 77 Sonneborn H.-H.: Gleichzeitige Auftrennung von AK- und ADA- Isoenzymen auf einer Folie. Humangenetik 15, 87 (1972).
- 78 Sonneborn H.-H.: Comments on the determination of isozyme polymorphism (ADA, AK, 6-PGD, PGM) by cellulose acetate electrophoresis. Humangenetik 17, 49 (1972).
- 79 Sonneborn H.-H., Renninger W.: Genfrequenzuntersuchungen der Adenosindesaminase-Isoenzyme mit einer neuen Technik. Humangenetik 10, 188 (1970).

- 80 Sorensen S.A.: The polymorphism of red cell acid phosphatase, phosphoglucomutase, adenosine deaminase, and adenylate kinase in twins. *Hum. Her.* 24, 236 (1974).
- 81 Spencer N., Hopkinson D.A., Harris H.: Adenosine deaminase polymorphism in man. *Ann. Hum. Genet.* 32, 9 (1968).
- 82 Szeinberg A., Pipano S., Rozansky Z., Ravid N.: Frequency of red cell adenosine deaminase phenotypes in several population groups in Israel. *Hum. Her.* 21, 357 (1971).
- 83 Tariwerdian G., Ritter H.: Population genetics of adenosine deaminase (EC:3.5.4.4.): Gene frequencies in Southwestern Germany. *Humangenetik* 7, 179 (1969).
- 84 Tariwerdian G., Ritter H.: Adenosine deaminase polymorphism (EC:3.5.4.4.): Formal genetics and linkage relations. *Humangenetik* 7, 176 (1969).
- 85 Tischfield J.A., Creagan R.P., Nichols L.A., Ruddle F.H.: Assignment of a gene for adenosine deaminase to human chromosome 20. *Hum. Her.* 24, 1 (1974).
- 86 Irotta F.F., Smithwick E.M., Balis A.E.: A normal level of adenosine deaminase activity in the red cell lysates of carriers and patients with severe combined immunodeficiency disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 104 (1976).
- 87 Van Belle H.: Uptake and deamination of adenosine by blood species differences, effect of pH, ions, temperature and metabolic inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 192, 124 (1969).
- 88 Wara D.W., Ammann A.J.: Laboratory data, in: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency a molecular defect. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London (1974). p. 247.

- 89 Weitkamp L., Neel J.V.: Gene frequencies and micro-differentiation among the Makiritare Indians.III. Nine erythrocyte enzyme systems.Amer. J. Hum. Genet. 22, 533 (1970).
- 90 Weitkamp L.R.: Further data on the genetic linkage relations of the adenosine deaminase. Hum. Her. 21, 351 (1971).
- 91 Welch Q.B., Lie-Injo L.E., Ganesan J.: Erythrocyte adenosine deaminase in Malaysians. Hum.Her. 25, 69 (1975).
- 92 Van der Weyden M.B., Buckley R.H., Kelley W.N.: Molecular form of adenosine deaminase in severe combined immunodeficiency. Biochem. Biophys. Res. Comm. 57, 590 (1974).
- 93 Wolfson J.J., Cross V.T.: The radiographic findings in forty-nine patients with combined immunodeficiency, in: Combined immunodeficiency disease a molecular defect. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London (1974), p. 262.
- 94 Wüst H.: Adenosine deaminase in lymphocytes and its electrophoretic separation . Hum. Her. 21, 607 (1971).
- 95 Wüst H.: Further studies on the adenosine deaminase (ADA) polymorphism in Austria. Vox. Sang. 21, 443 (1971).
- 96 Wüst H.: The red cell adenosine deaminase (ADA) polymorphism in Vienna. Vox. Sang. 20, 267 (1971).
- 97 Yount J., Nichols C., Ochs H.D., Hammar S.P., Scott C.R., Chen S.-H., Giblett E.R., Wedgwood J.: Absence of erythrocyte adenosine deaminase associated with severe combined immunodeficiency. J. Ped. 84, 173 (1974).
- 98 Zimmer J., Khalifa A.S., Lightbody J.J.: Decreased lymphocyte adenosine deaminase activity in acute lymphocytic leucemic children and their parents. Cancer Res. 35, 68 (1975).

Herrn Prof. Dr. W. Marget, Leiter der Abteilung für antimikrobielle Therapie der Kinderklinik der Universität München, bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor.

Herrn Dr. B. Belohradsky danke ich für die Vermittlung des Themas und seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. K. Betke, Direktor der Kinderklinik der Universität München, danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Schließlich gilt mein Dank noch Fräulein Roos und ganz besonders Fräulein K.Aasma für ihre freundliche Assistenz bei den Arbeiten im Labor.

Lebenslauf

Am 4. September 1952 wurde ich, Notburga Margarethe Hennig, geb. Raffelt, als Tochter des Diplom-Ingenieurs für Bauwesen Gottfried Raffelt und seiner Frau Margarethe Raffelt in Ebersbach/Sachsen, Kreis Löbau, geboren.

Meine Eltern flohen 1953 mit mir in die Bundesrepublik Deutschland; seither lebe ich im Raum München.

Im Herbst 1958 trat ich in die Volksschule Riemerling ein.

Von 1963 bis 1972 besuchte ich das Städtische Luisengymnasium München, wo ich 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im gleichen Jahr wurde ich an der Ludwig Maximilians-Universität München im Fach Humanmedizin immatrikuliert.

Die Ärztliche Vorprüfung legte ich im August 1974 ab, den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung im August 1975, den zweiten Teil im August 1976 und den dritten Teil im November 1978.

Seit 1975 bin ich mit dem Diplomphysiker Paul Hennig verheiratet.

